

541821

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004年7月29日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/063217 A1

- (51) 国際特許分類: C07K 7/06, 7/08, 14/82, A61K 39/00, A61P 35/00, 37/04
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000254
- (22) 国際出願日: 2004年1月15日 (15.01.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-007122 2003年1月15日 (15.01.2003) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒5620036 大阪府箕面市船場西2-19-30 Osaka (JP). 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo (JP). 住友製薬株式会社 (SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED) [JP/JP]; 〒5418510 大阪府大阪市中央区道修町2丁目2番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 高須 秀夫 (TAKASU, Hideo) [JP/JP]; 〒6620084 兵庫県西宮市樋之池町15-17-502 Hyogo (JP). 三溝 文雄 (SAMIZO, Fumio) [JP/JP]; 〒5650854 大阪府吹田市桃山台2-3-10-204 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒5400001 大阪府大阪市中央区城見1丁目3番7号IMPビル青山特許事務所 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DIMERIZED PEPTIDE

(54) 発明の名称: 二量体化ペプチド

(57) Abstract: It is intended to provide a novel cancer antigen peptide and a cancer vaccine comprising this cancer antigen peptide. A peptide dimer wherein two peptide monomers capable of forming a cancer antigen peptide containing at least one cysteine residue and consisting of from 7 to 30 amino acid residues are bonded to each other via a disulfide bond.

(57) 要約: 新たな癌抗原ペプチドおよび当該癌抗原ペプチドの癌ワクチンを提供する。少なくとも1つのシステイン残基を含みかつ7~30個のアミノ酸残基からなる、癌抗原ペプチドを生じさせる2つのペプチド単量体がジスルフィド結合により結合しているペプチド二量体に関する。

WO 2004/063217 A1

## 明 細 書

## 二量体化ペプチド

## 5 技術分野

本発明は、癌ワクチン療法の分野に属し、詳細には細胞傷害性T細胞誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせるペプチド二量体およびそれを含有する医薬組成物に関する。

## 10 背景技術

生体による癌細胞やウイルス感染細胞等の排除には細胞性免疫、とりわけ細胞傷害性T細胞（以下、CTLと称する）が重要な働きをしている。CTLは、癌細胞上の癌抗原タンパク質由来の抗原ペプチド（癌抗原ペプチド）とMHC

15 (Major Histocompatibility Complex) クラスI抗原（ヒトの場合はHLA抗原と称する）とにより形成される複合体を認識し、癌細胞を攻撃・破壊する。

癌抗原タンパク質は、Immunity, vol.10:281, 1999の表中に記載のものが代表例として挙げられる。具体的には、メラノサイト組織特異的タンパク質である gp100 (J. Exp. Med., 179: 1005, 1994)、MART-1 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3515, 1994)、およびチロシナーゼ (J. Exp. Med., 178: 20 489, 1993) などのメラノソーム抗原、ならびにメラノーマ以外の癌抗原タンパク質としてHER2/neu (J. Exp. Med., 181: 2109, 1995)、CEA (J. Natl. Cancer. Inst., 87:982, 1995)、およびPSA (J. Natl. Cancer. Inst., 89:293, 1997) などの癌マーカーがある。

25 癌抗原ペプチドは、癌抗原タンパク質が細胞内プロテアーゼによりプロセシングされて生成される約8から11個のアミノ酸から成るペプチドである (Cur. Opin, Immunol., 5: 709, 1993; Cur. Opin, Immunol., 5: 719, 1993; Cell, 82: 13, 1995; Immunol. Rev., 146: 167, 1995)。前記のように、この生成された癌抗原ペプチドとMHCクラスI抗原（HLA抗原）との複合体が細胞表面に提示され、CTLにより認識される。従って、CTLによる癌細胞破壊を利用

する癌免疫療法剤（癌ワクチン）を開発する場合、CTLを効率良く誘導できる癌抗原ペプチドを癌抗原タンパク質から同定することが、非常に重要となる。

#### 発明の開示

5       本発明の目的は、イン・ビボにて有用な癌抗原ペプチドから誘導される新たな癌抗原を提供することにある。

10       本発明者らは、癌抗原ペプチドとして証明されているペプチドの中にはシステイン残基が含まれているものがあり、意外にもこのようなペプチドを二量体化させて投与すると単量体と同等のCTLの誘導活性を有することを見出し、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明は、

（１） 少なくとも１つのシステイン残基を含みかつ７～３０個のアミノ酸残基からなる、CTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる２つのペプチド単量体が相互にジスルフィド結合により結合しているペプチド二量体；

15       （２） CTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる、上記（１）記載のペプチド二量体；

（３） ２つのペプチド単量体が１または２個のジスルフィド結合により結合している、上記（１）または（２）記載のペプチド二量体；

20       （４） ペプチド単量体が癌抑制遺伝子産物WT 1に由来する、上記（１）～（３）のいずれか記載のペプチド二量体；

25       （５） ペプチド単量体がCys Xaa Thr Trp Asn Gln Met Asn Xaa（配列番号：７２）（第２位のXaaは、Tyr、Phe、MetおよびTrpからなる群より選ばれる１つのアミノ酸残基を示し、第９位のXaaは、Phe、Leu、Ile、TrpおよびMetからなる群より選ばれる１つのアミノ酸残基を示す）である、上記（１）～（４）のいずれか記載のペプチド二量体；

（６） ペプチド単量体がCys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu（配列番号：１１）、Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe（配列番号：１８）、Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr（配列番号：１９）、Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu（配列番号：２０）、Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu

(配列番号：21)、Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：22)、  
Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu (配列番号：23) およびCys Tyr Thr  
Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：44) からなる群より選ばれる、上記

(1)～(4)のいずれか記載のペプチド二量体；

5 (7) 上記(1)～(6)のいずれか記載のペプチド二量体と製薬的に許容  
されうる担体とを含有してなる医薬組成物；

(8) 癌ワクチンとして使用される、上記(7)に記載の医薬組成物；

(9) 上記(1)～(6)のいずれか記載のペプチド二量体における、癌ワ  
クチンを製造するための使用；および

10 (10) 癌を治療または予防するための方法であって、上記(1)～(6)  
のいずれか記載のペプチド二量体の治療または予防に有効な量を、それを必要と  
しているWT1陽性の患者に投与方法：  
に関する。

#### 15 図面の簡単な説明

図1は、トランスジェニックマウスにおけるペプチド二量体(配列番号：4  
4)によるCTL誘導の結果を示すグラフである。

#### 発明を実施するための最良の形態

20 本発明のペプチド二量体は、2つのペプチド単量体間における少なくとも1対  
のシステイン残基のSH基間でのジスルフィド結合によって2つの単量体が相互  
に結合して二量体化している。

本発明のペプチド二量体はCTLの誘導能を有するものであり、誘導されたC  
TLは、細胞傷害作用やリンフォカインの産生を介して抗癌作用を発揮すること  
25 ができる。従って本発明の二量体は、癌の治療または予防のための癌ワクチンに  
使用することができる。

本発明のペプチド二量体を構成するペプチド単量体は、少なくとも1つのシス  
테인残基を含みかつ7～30個のアミノ酸残基からなり、そしてCTL誘導活  
性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる。「癌抗原ペプチドを生じさせる」とは、

ペプチド単量体がHLA抗原と結合して細胞傷害性T細胞（CTL）により認識される癌抗原ペプチドを生じさせる、という特性を有する意味である。ペプチド単量体は、それ自身CTL誘導活性を有している限り特に制限されるものではないが、多くの癌種で高発現しているヒトWilms癌の癌抑制遺伝子WT1

5 (Cell., 60:509, 1990、NCBIデータベースAccession No. XP\_034418、配列番号：1) に由来しかつシステイン残基を少なくとも1つ含有するものが好ましい。WT1遺伝子は、Wilms癌、無紅彩、泌尿生殖異常、精神発達遅延などを合併するWAGR症候群の解析からWilms癌の原因遺伝子の1つとして染色体11p13から単離され (Nature, 343:774, 1990)、そのゲノムDNAは約50kbであり10のエキソンから成り、そしてそのcDNAは約3kbである。cDNAから推定されるアミノ酸配列は、配列番号：1に示す通りである (Cell., 60:509, 1990)。WT1遺伝子はヒト白血病で高発現しており、白血病細胞をWT1アンチセンスオリゴマーで処理するとその細胞増殖が抑制される (特開平9-104627号公報) ことなどから、WT1遺伝子は白血病細胞の増殖に促進的に働いていることが示唆されている。さらに、WT1遺伝子は、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌においても高発現しており (特開平9-104627号公報および国際公開第00/06602号パンフレット)、白血病および固形癌における新しい癌抗原タンパク質であることが判明した (J. Immunol., 164: 1873-80, 2000およびJ. Clin. Immunol., 20, 195-202, 2000)。癌免疫療法 (癌ワクチン) は多くの癌患者に対して適用可能であることが好ましいことから、多くの癌種で高発現しているWT1における癌抗原ペプチドの同定、および当該癌抗原ペプチドを利用した癌ワクチンの開発は重要である。これに関し、国際公開第00/06602号パンフレットおよび国際公開第00/18795号パンフレットには、WT1タンパク質の部分から成る幾つかの天然型の癌抗原ペプチドが記載されているが、イン・ビボでの効果は知られていない。

25 本発明に用いられる他のペプチド単量体としては、Immunity, vol.10:281, 1999の表中に記載の癌抗原タンパク質由来の癌抗原ペプチドでありかつシステイン残基を少なくとも1つ含有するものが挙げられる。

C T L誘導活性は、H L Aテトラマー法 (Int. J. Cancer: 100, 565-570 (2002) ) または限界希釈法 (Nat. Med. :4, 321-327 (1998))によりC T Lの数を測定することにより確認することができる。あるいは、例えばHLA-A24拘束性のC T L誘導活性の場合、国際公開第02/47474号パンフレットおよびInt. J. Cancer: 100, 565-570 (2002)に記述されたHLA-A24モデルマウスを用いることなどにより調べることができる。

ペプチド単量体のアミノ酸残基の個数は7～30個であるが、8～12個が好ましく、9～11個がより好ましい。ペプチド単量体中のシステイン残基の数は、H L Aとの結合モチーフとペプチドの長さとを考慮し、1または2個であることが好ましい。

ペプチド単量体は、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて合成することができる。合成方法としては、文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis) , Interscience, New York, 1966 ; ザ・プロテインズ (The Proteins) , Vol 2 , Academic Press Inc. , New York, 1976 ; ペプチド合成, 丸善 (株) , 1975 ; ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) , 1985 ; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

得られたペプチド単量体は、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて分子間でジスルフィド結合を形成することができる。ジスルフィド結合の形成方法は、文献 (ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis) , Interscience, New York, 1966 ; ザ・プロテインズ (The Proteins) , Vol 2 , Academic Press Inc. , New York, 1976 ; ペプチド合成, 丸善 (株) , 1975 ; ペプチド合成の基礎と実験、丸善 (株) , 1985 ; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991) などに記載されている方法が挙げられる。

具体的には、ペプチド単量体に含まれるシステイン残基が1個の場合、システイン側鎖の保護基を含むすべての保護基を除去した後、ペプチド単量体を含む溶液をアルカリ条件下で空気酸化反応に付す方法、あるいは、アルカリ性または酸性条件下酸化剤を添加してジスルフィド結合を形成する方法などが挙げられる。ここで、酸化剤としては、ヨウ素、ジメチルスルホキシド (DMSO) 、フェリ

シアン化カリウムなどが挙げられる。

システイン残基が2個以上の場合も、前記と同様の方法を用いることができる。この場合はジスルフィド結合様式が異なる異性体が得られる。システイン側鎖の保護基を特定の組み合わせにすることにより、目的のシステイン残基間でジスルフィド結合を形成した二量体を得ることができる。前記保護基の組み合わせとしては、Me B z 1 (メチルベンジル) 基とA c m (アセトアミドメチル) 基、T r t (トリチル) 基とA c m基、N p y s (3-ニトロ-2-ピリジルチオ) 基とA c m基、S - B u - t (S-tert-ブチル) 基とA c m基などが挙げられる。例えばMe B z 1基とA c m基の組み合わせの場合、まずMe B z 1基とシステイン側鎖以外のその他の保護基を除去した後、ペプチド単量体を含む溶液を空気酸化反応に付して脱保護されたシステイン残基間にジスルフィド結合を形成し、次いでヨウ素による脱保護および酸化を行ってA c m基で保護されていたシステイン残基間にジスルフィド結合を形成する方法などが挙げられる。

得られたペプチド二量体は、通常のペプチド化学に用いられる方法に準じて精製することができる。ペプチド二量体の精製方法は、文献(ペプタイド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience, New York, 1966; ザ・プロテインズ (The Proteins), Vol 2, Academic Press Inc., New York, 1976; ペプチド合成, 丸善(株), 1975; ペプチド合成の基礎と実験, 丸善(株), 1985; 医薬品の開発 続 第14巻・ペプチド合成, 広川書店, 1991)などに記載されているが、HPLCが好ましい。

このようにして得られた本発明のペプチド二量体は、システイン残基がジスルフィド結合を形成していることにより、溶液中での酸化剤等に対する安定性に優れており、医薬品原料として一定の品質とCTLの誘導活性を保持するものである。

本発明に用いられるペプチド単量体の好ましい具体例としてWT 1を例に以下に示す。なお、本明細書においてアミノ酸残基を略号で表示する場合、次の3文字表記または1文字表記を用いる：

Ala (A) : アラニン残基、Arg (R) : アルギニン残基、Asn (N) : アスパラギン残基、Asp (D) : アスパラギン酸残基、Cys (C) : システイン残基、Gln

(Q) : グルタミン残基、Glu (E) : グルタミン酸残基、Gly (G) : グリシン残基、His (H) : ヒスチジン残基、Ile (I) : イソロイシン残基、Leu (L) : ロイシン残基、Lys (K) : リジン残基、Met (M) : メチオニン残基、Phe (F) : フェニルアラニン残基、Pro (P) : プロリン残基、Ser (S) : セリン残基、Thr

5 (T) : トレオニン残基、Trp (W) : トリプトファン残基、Tyr (Y) : チロシン残基、Val (V) : バリン残基。

表中、「位置」とは配列番号 1 に記載のヒト WT 1 におけるペプチドの位置を示す。

表 1

## HLA-A1拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
137-145	CLESQPAIR	2
80-88	GAEPHEEQC	3
354-362	QCDFKDCER	4
409-417	TSEKPFSCR	5
386-394	KTCQRKFSR	6
325-333	CAYPGCNKR	7
232-240	QLECMTWNQ	8
317-325	TSEKRPFMC	9

10

表 2

## HLA-A0201拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
280-288	ILCGAQYRI	10
235-243	CMTWNQMNL	11
227-235	YQMTSQLEC	12

8

408-416	KTSEKPFSC	13
228-236	QMTSQLECM	14
86-94	EQCLSAFTV	15

表 3

HLA-A0205拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
235-243	CMTWNQMNL	11
227-235	YQMTSQLEC	12
194-202	SVPPPVYGC	16
280-288	ILCGAQYRI	10
81-89	AEPHEEQCL	17

表 4

HLA-A24拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
356-364	DFKDCERRF	18
326-334	AYPGCNKRY	19
130-138	NAPYLPSC	20
329-337	GCNKRYFKL	21
417-425	RWPSCQKKF	22
207-215	DSCTGSQAL	23
235-243	CMTWNQMNL	11
235*-243	CYTWNQMNL	44

\*: 配列番号11において、236位MをYに改変

表 5

## HLA-A3拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
88-96	CLSAFTVHF	24
137-145	CLESQPAIR	2
280-288	ILCGAQYRI	10
386-394	KTCQRKFSR	6
235-243	CMTWNQMNL	11
383-391	FQCKTCQRK	25
194-202	SVPPPVYGC	16

表 6

## HLA-A68.1拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
100-108	FTGTAGACR	26
386-394	KTCQRKFSR	6
409-417	TSEKPFSCR	5
325-333	CAYPGCNKR	7
354-362	QCDFKDCER	4
324-332	MCAYPGCNK	27
379-387	GVKPFQCKT	28
137-145	CLESQPAIR	2

表 7

## HLA-A1101拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
386-394	KTCQRKFSR	6
383-391	FQCKTCQRK	25
100-108	FTGTAGACR	26
324-332	MCAYPGCNK	27
415-423	SCRWPSCQK	29
137-145	CLESQPAIR	2
325-333	CAYPGCNKR	7

表 8

HLA-A3101拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
386-394	KTCQRKFSR	6
137-145	CLESQPAIR	2
100-108	FTGTAGACR	26
325-333	CAYPGCNKR	7
279-287	PILCGAQYR	30
354-362	QCDFKDCER	4
383-391	FQCKTCQRK	25
358-366	KDCERRFSR	31

表 9

HLA-A3302拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
409-417	TSEKPFSCR	5
137-145	CLESQPAIR	2

354-362	QCDFKDCER	4
100-108	FTGTAGACR	26
325-333	CAYPGCNKR	7
207-215	DSCTGSQAL	23
419-427	PSCQKKFAR	32

表 1 0

HLA-B14拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
329-337	GCNKRYFKL	33

表 1 1

HLA-B40拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
81-89	AEPHEEQCL	17
410-418	SEKPFSCRW	34
318-326	SEKRPFMCA	35
233-241	LECMTWNQM	36
349-357	GEKPYQCDF	37
85-93	EEQCLSAFT	38
23-31	GCALPVSGA	39
206-214	TDSCTGSQA	40
24-32	CALPVSGAA	41
84-92	HEEQCLSAF	42

表 1 2

## HLA-B60拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
81-89	AEPHEEQCL	17
233-241	LECMTWNQM	36
209-217	CTGSQALLL	43
318-326	SEKRPFMCA	35
329-337	GCNKRYFKL	33
130-138	NAPYLPSCL	20
85-93	EEQCLSAFT	38
208-216	SCTGSQALL	45
207-215	DSCTGSQAL	23
18-26	LGGGGGCAL	46

表 1 3

## HLA-B61拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
318-326	SEKRPFMCA	35
81-89	AEPHEEQCL	17
233-241	LECMTWNQM	36
85-93	EEQCLSAFT	38
206-214	TDSCTGSQA	40
20-28	GGGGCALPV	47
23-31	GCALPVSGA	39

表 1 4

## HLA-B62拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
88-96	CLSAFTVHF	24
17-25	SLGGGGGCA	48
384-392	QCKTCQRKF	49
227-235	YQMTSQLEC	12
86-94	EQCLSAFTV	15
101-109	TGTAGACRY	50
280-288	ILCGAQYRI	10

表 1 5

HLA-B7拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCL	20
208-216	SCTGSQALL	45
18-26	LGGGGGCAL	46
207-215	DSCTGSQAL	23
209-217	CTGSQALLL	43
329-337	GCNKRYFKL	33
235-243	CMTWNQMNL	11

表 1 6

HLA-B8拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
329-337	GCNKRYFKL	33
208-216	SCTGSQALL	45

14

130-138	NAPYLPSC	20
420-428	SCQKKFARS	51
387-395	TCQRKFSRS	52
207-215	DSCTGSQAL	23
384-392	QCKTCQRKF	49
136-144	SCLESQPAI	53
347-355	HTGEKPYQC	54

表 1 7

HLA-B2702拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
416-424	CRWPSCQKK	55
107-115	CRYGPFQPP	56

表 1 8

HLA-B2705拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
416-424	CRWPSCQKK	55
383-391	FQCKTCQRK	25

5

表 1 9

HLA-B3501拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
278-286	TPILCGAQY	57
327-335	YPGCNKRYF	58

15

82-90	EPHEEQCLS	59
207-215	DSCTGSQAL	23
412-420	KPFSCRWPS	60

表 2 0

HLA-B3701拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
81-89	AEPHEEQCL	17
85-93	EEQCLSAFT	38
208-216	SCTGSQALL	45
209-217	CTGSQALLL	43
206-214	TDSCCTGSQA	40
84-92	HEEQCLSAF	42
233-241	LECMTWNQM	36
349-357	GEKPYQCDF	37

表 2 1

HLA-B3801拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
202-210	CHTPDSCCT	61
417-425	RWPSCQKKF	22
327-335	YPGCNKRYF	58
208-216	SCTGSQALL	45
18-26	LGGGGGCAL	46
83-91	PHEEQCLSA	62

表 2 2

## HLA-B3901拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
136-144	SCLESQPAI	53
208-216	SCTGSQALL	45
207-215	DSCTGSQAL	23

表 2 3

## HLA-B3902拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCL	20
209-217	CTGSQALLL	43
207-215	DSCTGSQAL	23
208-216	SCTGSQALL	45
329-337	GCNKRYFKL	33

表 2 4

## HLA-B4403拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
349-357	GEKPYQCDF	37
84-92	HEEQCLSAF	42
410-418	SEKPFSCRW	34
278-286	TPILCGAQY	57
318-326	SEKRPFMCA	35
81-89	AEPHEEQCL	17

101-109	TGTAGACRY	50
85-93	EEQCLSAFT	38
233-241	LECMTWNQM	36
104-112	AGACRYGPF	63

表 2 5

## HLA-B5101拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCCL	20
20-28	GGGGCALPV	47
18-26	LGGGGGCAL	46
418-426	WPSCQKKFA	64
82-90	EPHEEQCLS	59
280-288	ILCGAQYRI	10
204-212	TPTDSCTGS	65

表 2 6

## HLA-B5102拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLPSCCL	20
20-28	GGGGCALPV	47
412-420	KPFSCRWPS	60
18-26	LGGGGGCAL	46
24-32	CALPVSGAA	66
136-144	SCLESQPAI	53
418-426	WPSCQKKFA	64

18

351-359	KPYQCDFKD	67
---------	-----------	----

表 2 7

HLA-B5201拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
86-94	EQCLSAFTV	15
20-28	GGGGCALPV	47
327-335	YPGCNKRYF	58
104-112	AGACRYGPF	63

表 2 8

HLA-B5801拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
230-238	TSQLECMTW	68
408-416	KTSEKPFSC	13
276-284	HTTPILCGA	69
347-355	HTGEKPYQC	54
317-325	TSEKRPFMC	9

5

表 2 9

HLA-CW0301拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
329-337	GCNKRYFKL	21
24-32	CALPVSGAA	41
136-144	SCLESQPAI	53

19		
130-138	NAPYLP SCL	20

表 3 0

HLA-CW0401拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
356-364	DFKDCERRF	18
327-335	YPGCNKRYF	58
326-334	AYPGCNKRY	19
417-425	RWPSCQKKF	22
278-286	TPILCGAQY	57
99-107	QFTGTAGAC	70

表 3 1

HLA-CW0602拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
130-138	NAPYLP SCL	20
319-327	EKRPFMCAY	71
207-215	DSCTGSQAL	23

5

表 3 2

HLA-CW0702拘束性ペプチド単量体

位置	アミノ酸配列	配列番号
319-327	EKRPFMCAY	71
326-334	AYPGCNKRY	19
278-286	TPILCGAQY	57

327-335	YPGCNKRYF	58
101-109	TGTAGACRY	50
130-138	NAPYLPSC	20
84-92	HEEQCLSAF	42

HLA分子には多くのサブタイプが存在し、結合できる抗原ペプチドのアミノ酸配列にはそれぞれのタイプについて規則性（結合モチーフ）が存在することが知られている。HLA-A24の結合モチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がチロシン（Tyr）、フェニルアラニン（Phe）、メチオニン（Met）またはトリプトファン（Trp）であり、C末端のアミノ酸がフェニルアラニン（Phe）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）、トリプトファン（Trp）またはメチオニン（Met）となることが知られている（J. Immunol., 152, p3913, 1994、Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155, p4307, 1994）。従って、上記表4に示すペプチド単量体に加え、ペプチド単量体がCys Xaa Thr Trp Asn Gln Met Asn Xaa（配列番号：72）（第2位のXaaは、Tyr、Phe、MetおよびTrpからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示し、第9位のXaaは、Phe、Leu、Ile、TrpおよびMetからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示す）であるペプチドも、HLA-A24拘束性ペプチド単量体として好適に用いられる。

またHLA-A0201の結合モチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がロイシン（Leu）またはメチオニン（Met）であり、C末端のアミノ酸がバリン（Val）またはロイシン（Leu）となることが知られている。HLA-A0205の結合モチーフとして、8～11アミノ酸からなるペプチドのうちの第2位のアミノ酸がバリン（Val）、ロイシン（Leu）、イソロイシン（Ile）またはメチオニン（Met）であり、C末端のアミノ酸がロイシン（Leu）となることが知られている（Immunogenetics, 41, p178, 1995、J. Immunol., 155:p4749, 1995）。従って、上記表2または3に示すペプチド単量体の第2位のアミノ酸またはC末端のアミノ酸を上記モチーフのいずれかに置換したペプチドもHLA-A0201またはHLA-A0205拘束性ペプチド単量体として好適に用いられる。

上記表4に示すペプチド単量体が本発明においては特に好適に用いられる。表

4 中、配列番号：44のペプチドは、配列番号：11（235～243位）のアミノ酸配列において236位のメチオニンをチロシンに改変した非天然の改変型ペプチドである。よって、本発明におけるペプチド単量体には、天然型ペプチド中のシステイン残基以外の残基を一部改変したペプチドであって、CTLの誘導活性を有するペプチドも含まれる。

本発明は別の態様として、本発明のペプチド二量体と製薬的に許容されうる担体とを含有する医薬組成物を提供する。医薬組成物中の有効成分であるペプチド二量体の量は、治療目的の疾患、患者の年齢、体重等により適宜調整することができるが、通常0.0001mg～1000mg、好ましくは0.001mg～1000mg、より好ましくは0.1mg～20mgである。

本発明医薬組成物には有効成分として、本発明ペプチド二量体だけでなく、ペプチド単量体を含むことができる。本発明医薬組成物中に含まれる「ペプチド二量体」の割合は、CTLの誘導活性をもたらす限り特に制限されるものではないが、全ペプチド中50%以上であり、70～100%が好ましく、80～100%がより好ましい。ペプチド二量体の割合は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により確認することができる。

製薬的に許容されうる担体は、細胞性免疫を増強する作用を有するものである。当該担体としては、例えばアジュバントが挙げられる。アジュバントとしては、文献（Clin. Microbiol. Rev., 7:277-289, 1994）に記載のものなどが応用可能であり、具体的には、菌体由来成分、サイトカイン、植物由来成分、水酸化アルミニウム如き鉱物ゲル、リソレシチン、プルロニックポリオールの如き界面活性剤、ポリアニオン、ペプチド、または油乳濁液（エマルジョン製剤）などを挙げることができる。また、リポソーム製剤、直径数 $\mu\text{m}$ のビーズに結合させた粒子状の製剤、リピッドを結合させた製剤などの製剤化に必要な成分も担体に含まれる。

本発明医薬組成物の投与方法としては、皮内投与、皮下投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられる。CTLを効率よく誘導する皮内投与や皮下投与が好ましい。投与回数および投与間隔は、治療または予防目的の疾患、患者の個体差により適宜調整することができるが、通常複数回であり、数日ないし数月に1回

投与するのが好ましい。

例えば、WT I 由来のペプチド単量体から構成されるペプチド二量体を含有する本発明医薬組成物をWT I 陽性の患者に投与すると、抗原提示細胞のHLA抗原にペプチドが提示され、提示されたHLA抗原複合体特異的CTLが増殖して癌細胞を破壊することができ、従って、癌の治療または予防が可能となる。本発明の医薬組成物は、WT I 遺伝子の発現レベルの上昇を伴う癌、例えば白血病、骨髓異形成症候群、多発性骨髄腫、悪性リンパ腫などの血液性の癌や、胃癌、大腸癌、肺癌、乳癌、胚細胞癌、肝癌、皮膚癌、膀胱癌、前立腺癌、子宮癌、子宮頸癌、卵巣癌等の固形癌の予防または治療のために使用することができる。

本発明はさらに別の態様として、本発明の医薬組成物をWT I 陽性の患者に投与することにより、癌を治療または予防するための方法を提供する。

#### 実施例

以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらによりなんら限定されるものではない。

#### 製造例 1

1. 保護ペプチド樹脂(H-Cys(Trt)-Tyr(Trt)-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Met-Asn(Trt)-Leu-Alko-Resin)の合成

Fmoc-Leu-Alko-樹脂 (ここに、Alkoはp-アラルコキシベンジルアルコール) 12 g (渡辺化学製 ; 0.81mmol/g)をAdvanced ChemTech社製ACT90型固相合成機の500ml反応槽内に入れ、一旦この樹脂をDMF等で洗浄後 (工程 1)、25%Pip (ピペリジン) で処理 (3分×1回及び15分×1回) してFmoc基を切断後 (工程 2)、再びDMF等で樹脂を洗浄し (工程 1)、Pipを除去した。この反応槽内に、Fmoc-Asn(Trt)-OH 29.36gとHOBT (1-ヒドロキシベンゾトリアゾール) 7.5gをNMP (N-メチルピロリジノン) 150mlに溶解した溶液を加え、更にDIPCI (N, N'-ジイソプロピルカルボジイミド) 7.6mlを加えて 30分間室温撹拌を行った (工程 3)。30分後、NMPで樹脂を洗浄し (工程 4)、Fmoc-Asn(Trt)-OH 29.36gとHOBT 7.5gを用いて再度カップリング反応を行い (工程 5)、Fmoc-Asn(Trt)-Leu-Alko樹脂を合成した。その後、工程 2 の脱保

護操作を行い、H-Asn(Trt)-Leu-Alko-樹脂とした。次いで、工程1の洗浄操作を行い、Fmoc-Met-OH 18.27g、Fmoc-Gln(Trt)-OH 30.04g、Fmoc-Asn(Trt)-OH 29.36g、Fmoc-Trp(Boc)-OH 25.91g、Fmoc-Thr(tBu)-OH 19.56g、Fmoc-Tyr(tBu)-OH 22.60g、Fmoc-Cys(Trt)-OH 28.82gを順次加え、工程3のカップリング反応を行った。但しFmoc-Thr(tBu)-OHについてはカップリングを3回繰り返して行った後、得られた樹脂をDMFで洗浄後、25%AC<sub>2</sub>O（無水酢酸）で15分×2回で未反応のアミノ基をキャッピングした。N末端のFmoc-Cys(Trt)-OHを縮合後、工程2の脱保護操作を行い、工程6の洗浄操作を実施し、H-Cys(Trt)-Tyr(Trt)-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Met-Asn(Trt)-Leu-Alko-Resinを得た。上記合成工程の概要を表33に示す。

表 3 3

## &lt;合成工程&gt;

工程	試薬	処理回数	時間(分)
1) 洗浄	DMF	100ml × 6	0.3
	MeOH	100ml × 1	0.3
	DMF	100ml × 3	0.3
2) 脱保護	25%ピペリジン/DMF	100ml	3.0
		100ml	15.0
3) カップリング	各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) HOBT (5当量) DIPCI (5当量) /NMP	30 × 1 150ml	
4) 洗浄	NMP	100ml × 2	0.3
5) カップリング	各アミノ基保護アミノ酸 (5当量) HOBT (5当量) DIPCI (5当量) /NMP	30 × 1 150ml	
6) 洗浄	DMF	100ml × 5	0.3
	MeOH	100ml × 1	0.3
	DMF	100ml × 2	0.3

## 15 2. 保護ペプチド樹脂の脱保護

上記操作によって得られた保護ペプチド樹脂(H-Cys(Trt)-Tyr(Trt)-Thr(tBu)-Trp(Boc)-Asn(Trt)-Gln(Trt)-Met-Asn(Trt)-Leu-Alko-Resin 14.06g)にReagent

K(5%フェノール/5%チオアニソール/5% $H_2O$ /2.5%エタンジチオール/TFA溶液)100mlとトリイソプロピルシラン (TIPS) 15mlを加え、室温で2.5時間攪拌した。その後、ジエチルエーテル約500mlを加え、グラスフィルターで濾過を行い、Reagent Kとジエチルエーテルを濾液として除いた。濾上物を約100mlのジエチルエーテルで3回洗浄し、洗浄後の濾上物に約100mlのTFAを加える操作を3回繰り返して行い、目的物を含む濾液を約300ml得た。この濾液を濃縮してTFAを除き、アセトニトリル約50mlと20%酢酸水約250ml加え凍結乾燥し、パウダー状の粗ペプチド(H-Cys-Tyr-Thr-Trp-Asn-Gln-Met-Asn-Leu-OH、配列番号：44)6.12gを得た。

### 3. 粗ペプチドの精製

得られた粗ペプチド749mgをTFA 10mlに溶解し、HPLC(Shimadzu製；LC8AD型) 1液= $H_2O$ /0.1%TFAで平衡化しているYMC社製 ODS  $C_{18}$  5cm $\Phi$ ×50cmLのカラムにHPLCのポンプでチャージした。その状態で約30分間保ち、30分後、2液= $CH_3CN$ /0.1%TFAの濃度を30分間で0%から15%迄上昇した。その後、更に330分かけて28%まで2液の濃度を上昇させ、目的とするペプチドの溶出液を220nmのUVでモニターしながら、目的物を含む分画を集めた。集めた分画を、YMC社製ODS  $C_{18}$  4.6mm $\Phi$ ×25cmLカラムをセットしたHPLC(日立製 L-4000型)で1液= $H_2O$ /0.1%TFAと2液= $CH_3CN$ /0.1%TFAの溶出液で、2液= $CH_3CN$ /0.1%TFAの濃度を17%で平衡化しているカラムに注入し、220nmのUVでモニターしながら2液の濃度47%まで30分間で上昇させ、保持時間14.79分の目的ペプチド単量体の精製品227.5mgを得た。

#### ・アミノ酸分析

加水分解：1%フェノール/6N塩酸水、110℃ 10時間

分析法：ニンヒドリン法

Asx:1.71(2) Thr:0.75(1) Glx:1.07(1) Met:0.91(1) \* Leu:(1)

Tyr:0.82(1)

\* ) Leu=基準アミノ酸 ( ) 内 理論値

- ・質量分析：LC/MS  $M^{+1}=1173.0$  (理論値=1172.36)
- ・アミノ酸配列分析：N末2残基目 Tyrから、C末Leuまで順次確認した。

### 実施例 1

- 5 次式で示される二量体の合成：

C-Y-T-W-N-Q-M-N-L-OH

|

C-Y-T-W-N-Q-M-N-L-OH

- 10 製造例 1 により得られたペプチド単量体227.5mg、N-メチルグルカミン (NMG) 227.5mg、水23mlを加え室温で約2日間攪拌することにより、空気酸化を行った。その後、反応液中に酢酸ナトリウム2gを水5mlに溶解した水溶液を加え約20分間室温攪拌を行い、更に水200mlとアセトニトリル約200mlを加えた後、桐山ロート (ろ紙 No5C) で濾過し、濾上物を水 (約50ml×3回) で洗浄した。
- 15 濾上物を濾取し、水約200mlを加えて凍結乾燥を行い、目的とする粗ペプチド二量体158mgを得た。

### 粗ペプチド二量体の精製

- 粗ペプチド二量体158mgをDMSO 9mlに溶解し、HPLC(Shimadzu製；
- 20 LC8AD型)に 1 液= $H_2O$ /1%AcOHで平衡化しているYMC社製ODS  $C_{18}$  5cm  $\Phi$  ×50cmLのカラムにHPLCのポンプでチャージした。その状態で約30分間保ち、30分後、2 液= $CH_3CN$ /1%AcOHの濃度を360分間で0%から40%迄上昇した。その後、目的とする二量体の溶出液を220nmのUVでモニターしながら、自動分画装置により目的物を含む分画を集めた。集めた分画を、YMC社製ODS  $C_{18}$
- 25 4.6mm  $\Phi$  ×25cmLカラムをセットしたHPLC(日立製 L-4000型)で 1 液= $H_2O$ /0.1%TFAと 2 液= $CH_3CN$ /0.1%TFAの溶出液で、2 液= $CH_3CN$ /0.1%TFAの濃度を17%で平衡化しているカラムに注入し、220nmのUVでモニターしながら 2 液の濃度を0%から47%まで30分で上昇させ、保持時間 20.51分の目的とするペプチド二量体精製品46.6mgを得た。

FAB.MS 2365.0 (理論値 2342.70) Na<sup>+</sup>

F=0.25%

## 試験例 1

## ペプチド二量体によるCTL誘導

- 5 実施例 1 にて調製したペプチド二量体のCTL誘導能をHLA-A24トランスジェニックマウス (Int. J. Cancer: 100, 565, 2002) を用いて評価した。ペプチド二量体をジメチルスルホキシド(DMSO)で溶解し、40 mg/ml のペプチド溶液を作製した。このペプチド溶液35  $\mu$  l を581  $\mu$  l の10mMリン酸緩衝液 (pH 7.5) に添加してペプチド懸濁液を調製した。このペプチド懸濁液550  $\mu$  l と
- 10 Montanide ISA51 (Seppic社) 700  $\mu$  l を連結したガラスシリンジを用いて混合し、エマルションを作製して投与液を調製した。

- 投与液200  $\mu$  l をHLA-A24トランスジェニックマウスの尾根部皮下に投与した。マウスは3匹用いた。投与7日後に脾臓を摘出し、脾細胞を調製した。脾細胞の一部を100  $\mu$  g/ml のペプチド二量体で1時間パルスした。ペプチドをパルスしていない脾細胞を24穴プレートに7  $\times 10^6$  個/wellで播種し、更に上記の
- 15 ペプチドをパルスした脾細胞を1  $\times 10^6$  個/well添加して培養した。培養液には、RPMI1640培地に10%FCS、10mM HEPES、20mM L-グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウム、1mM MEM非必須アミノ酸、1% MEMビタミン、55  $\mu$  M 2-メルカプトエタノールを含ませ、5日間培養した。

- 20 培養した脾細胞中の投与ペプチド特異的なCTLの活性を<sup>51</sup>Crリリースアッセイ(J. Immunol.: 159, 4753, 1997)により測定した。標的細胞としては、HLA-A24とH-2K<sup>b</sup> のキメラのMHCクラス I 分子(Int. J. Cancer: 100, 565, 2002)を安定的に発現するようにマウスリンパ腫由来細胞株EL-4細胞(ATCC株番号TIB-39)に遺伝子導入して作製した細胞株EL-4-A2402/K<sup>b</sup> を用いた。標的細胞は
- 25 3.7Mbpq/10<sup>6</sup> 個で<sup>51</sup>Crラベル後、前記ペプチドを100  $\mu$  g/mlになるように添加して更に1時間パルスした。またペプチド非パルスの標的細胞を2時間<sup>51</sup>Crラベルしてコントロール標的細胞とした。これらのラベルされた標的細胞と先に調製された脾細胞を1:120の割合で混合して4時間培養し、傷害を受けた標的細胞の割合よりCTL活性を求めた。結果を図1に示した。前記ペプチドを投与したマウ

スより調製した脾細胞は、ペプチドをパルスした標的細胞を強く傷害したが、コントロールのペプチドをパルスしていない標的細胞に対する傷害性は弱かったことから、ペプチド特異的CTLが誘導されていることが明らかとなった。

## 5 産業上の利用可能性

本発明により、インビボにおいてCTL誘導活性を有するペプチド二量体およびそれを有効成分として含有する医薬組成物が提供される。本発明は、多くの癌患者の病態の改善に有効であると考えられる。

## 請 求 の 範 囲

1. 少なくとも1つのシステイン残基を含みかつ7～30個のアミノ酸残基からなる、CTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる2つのペプチド単量体が相互にジスルフィド結合により結合しているペプチド二量体。

2. CTL誘導活性を有する癌抗原ペプチドを生じさせる、請求項1記載のペプチド二量体。

3. 2つのペプチド単量体が1または2個のジスルフィド結合により結合している、請求項1または2記載のペプチド二量体。

4. ペプチド単量体が癌抑制遺伝子産物WT1に由来する、請求項1～3のいずれか記載のペプチド二量体。

5. ペプチド単量体がCys Xaa Thr Trp Asn Gln Met Asn Xaa (配列番号：72) (第2位のXaaは、Tyr、Phe、MetおよびTrpからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示し、第9位のXaaは、Phe、Leu、Ile、TrpおよびMetからなる群より選ばれる1つのアミノ酸残基を示す)である請求項1～4のいずれか記載のペプチド二量体。

6. ペプチド単量体がCys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：11)、Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe (配列番号：18)、Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr (配列番号：19)、Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu (配列番号：20)、Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu (配列番号：21)、Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe (配列番号：22)、Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu (配列番号：23) およびCys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu (配列番号：44) からなる群より選ばれる、請求項1～4のいずれか記載のペプチド二量体。

7. 請求項1～6のいずれか記載のペプチド二量体と製薬的に許容されうる担体とを含有してなる医薬組成物。

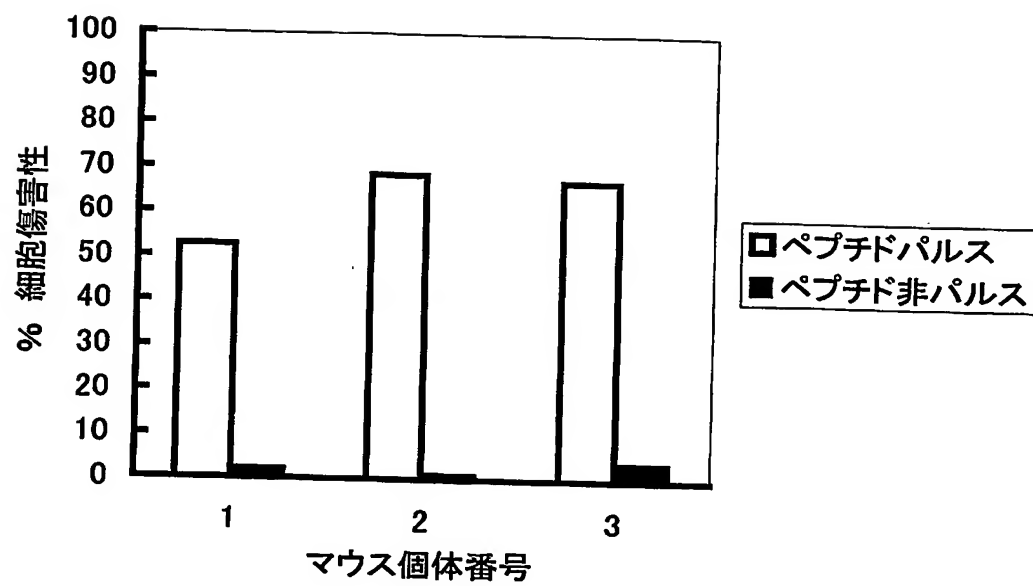
8. 癌ワクチンとして使用される、請求項7記載の医薬組成物。

9. 請求項1～6のいずれか記載のペプチド二量体における、癌ワクチンを製造するための使用。

10. 癌を治療または予防するための方法であって、請求項1～6のいずれか記載のペプチド二量体の治療または予防に有効な量を、それを必要としているWT1陽性の患者に投与方法。

1/1

図 1



## SEQUENCE LISTING

<110> Haruo Sugiyama  
Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha  
SUMITOMO PHARMACEUTICALS COMPANY, LIMITED

<120> Dimerized peptides

<130> 664263

<140>

<141> 2004-01-15

<150> JP 2003-007122

<151> 2003-01-15

<160> 71

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 449

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Ser Asp Val Arg Asp Leu Asn Ala Leu Leu Pro Ala Val Pro  
1 5 10 15

Ser Leu Gly Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala  
20 25 30

Gln Trp Ala Pro Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala Ser Ala Tyr  
35 40 45

Gly Ser Leu Gly Gly Pro Ala Pro Pro Pro Ala Pro Pro Pro Pro Pro  
50 55 60

Pro Pro Pro Pro His Ser Phe Ile Lys Gln Glu Pro Ser Trp Gly Gly  
65 70 75 80

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
85 90 95

Ser Gly Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
100 105 110

Gly Pro Pro Pro Pro Ser Gln Ala Ser Ser Gly Gln Ala Arg Met Phe

2/22

115 120 125  
Pro Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
130 135 140  
Arg Asn Gln Gly Tyr Ser Thr Val Thr Phe Asp Gly Thr Pro Ser Tyr  
145 150 155 160  
Gly His Thr Pro Ser His His Ala Ala Gln Phe Pro Asn His Ser Phe  
165 170 175  
Lys His Glu Asp Pro Met Gly Gln Gln Gly Ser Leu Gly Glu Gln Gln  
180 185 190  
Tyr Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys His Thr Pro Thr Asp Ser  
195 200 205  
Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu Arg Thr Pro Tyr Ser Ser Asp  
210 215 220  
Asn Leu Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln  
225 230 235 240  
Met Asn Leu Gly Ala Thr Leu Lys Gly Val Ala Ala Gly Ser Ser Ser  
245 250 255  
Ser Val Lys Trp Thr Glu Gly Gln Ser Asn His Ser Thr Gly Tyr Glu  
260 265 270  
Ser Asp Asn His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile  
275 280 285  
His Thr His Gly Val Phe Arg Gly Ile Gln Asp Val Arg Arg Val Pro  
290 295 300  
Gly Val Ala Pro Thr Leu Val Arg Ser Ala Ser Glu Thr Ser Glu Lys  
305 310 315 320  
Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys  
325 330 335  
Leu Ser His Leu Gln Met His Ser Arg Lys His Thr Gly Glu Lys Pro  
340 345 350  
Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg Ser Asp  
355 360 365  
Gln Leu Lys Arg His Gln Arg Arg His Thr Gly Val Lys Pro Phe Gln

3/22

370

375

380

Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser Asp His Leu Lys Thr  
385 390 395 400

His Thr Arg Thr His Thr Gly Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
405 410 415

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser Asp Glu Leu Val  
420 425 430

Arg His His Asn Met His Gln Arg Asn Met Thr Lys Leu Gln Leu Ala  
435 440 445

Leu

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 2

Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile Arg  
1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 3

Gly Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys  
1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

4/22

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 4

Gln Cys Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg  
1 5

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 5

Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg  
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 6

Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg  
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 7

Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg  
1 5

<210> 8

<211> 9

5/22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 8

Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln

1

5

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 9

Thr Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys

1

5

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 10

Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg Ile

1

5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 11

Cys Met Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

6/22

<210> 12  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 12  
Tyr Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys  
1 5

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 13  
Lys Thr Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys  
1 5

<210> 14  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 14  
Gln Met Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met  
1 5

<210> 15  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

7/22

&lt;400&gt; 15

Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val

1

5

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 16

Ser Val Pro Pro Pro Val Tyr Gly Cys

1

5

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 17

Ala Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu

1

5

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 18

Asp Phe Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe

1

5

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

8/22

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 19

Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr  
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 20

Asn Ala Pro Tyr Leu Pro Ser Cys Leu  
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 21

Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu  
1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 22

Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe  
1 5

9/22

<210> 23  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 23  
Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu  
1 5

<210> 24  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 24  
Cys Leu Ser Ala Phe Thr Val His Phe  
1 5

<210> 25  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 25  
Phe Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys  
1 5

<210> 26  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

10/22

&lt;400&gt; 26

Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg  
1 5

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 27

Met Cys Ala Tyr Pro Gly Cys Asn Lys  
1 5

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 28

Gly Val Lys Pro Phe Gln Cys Lys Thr  
1 5

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 29

Ser Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys  
1 5

&lt;210&gt; 30

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

11/22

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 30

Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr Arg  
1 5

&lt;210&gt; 31

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 31

Lys Asp Cys Glu Arg Arg Phe Ser Arg  
1 5

&lt;210&gt; 32

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 32

Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg  
1 5

&lt;210&gt; 33

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 33

Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe Lys Leu  
1 5

12/22

<210> 34  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 34  
Ser Glu Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp  
1 5

<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 35  
Ser Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala  
1 5

<210> 36  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 36  
Leu Glu Cys Met Thr Trp Asn Gln Met  
1 5

<210> 37  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 37

13/22

Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe  
1 5

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 38

Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe Thr  
1 5

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 39

Gly Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala  
1 5

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 40

Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala  
1 5

&lt;210&gt; 41

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

14/22

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 41

Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala

1

5

&lt;210&gt; 42

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 42

His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala Phe

1

5

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 43

Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu Leu

1

5

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 44

Cys Tyr Thr Trp Asn Gln Met Asn Leu

1

5

&lt;210&gt; 45

<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 45  
Ser Cys Thr Gly Ser Gln Ala Leu Leu  
1 5

<210> 46  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 46  
Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu  
1 5

<210> 47  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 47  
Gly Gly Gly Gly Cys Ala Leu Pro Val  
1 5

<210> 48  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 48  
Ser Leu Gly Gly Gly Gly Cys Ala

16/22

1

5

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 49

Gln Cys Lys Thr Cys Gln Arg Lys Phe

1

5

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 50

Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys Arg Tyr

1

5

&lt;210&gt; 51

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 51

Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala Arg Ser

1

5

&lt;210&gt; 52

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

17/22

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 52

Thr Cys Gln Arg Lys Phe Ser Arg Ser  
1 5

<210> 53

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 53

Ser Cys Leu Glu Ser Gln Pro Ala Ile  
1 5

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 54

His Thr Gly Glu Lys Pro Tyr Gln Cys  
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 55

Cys Arg Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys  
1 5

<210> 56

<211> 9

18/22

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 56

Cys Arg Tyr Gly Pro Phe Gly Pro Pro

1

5

&lt;210&gt; 57

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 57

Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala Gln Tyr

1

5

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 58

Tyr Pro Gly Cys Asn Lys Arg Tyr Phe

1

5

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 59

Glu Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser

1

5

19/22

<210> 60  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 60  
Lys Pro Phe Ser Cys Arg Trp Pro Ser  
1 5

<210> 61  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 61  
Cys His Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr  
1 5

<210> 62  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 62  
Pro His Glu Glu Gln Cys Leu Ser Ala  
1 5

<210> 63  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

20/22

&lt;400&gt; 63

Ala Gly Ala Cys Arg Tyr Gly Pro Phe  
1 5

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 64

Trp Pro Ser Cys Gln Lys Lys Phe Ala  
1 5

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 65

Thr Pro Thr Asp Ser Cys Thr Gly Ser  
1 5

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

&lt;400&gt; 66

Cys Ala Leu Pro Val Ser Gly Ala Ala  
1 5

&lt;210&gt; 67

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 67

Lys Pro Tyr Gln Cys Asp Phe Lys Asp  
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 68

Thr Ser Gln Leu Glu Cys Met Thr Trp  
1 5

<210> 69

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 69

His Thr Thr Pro Ile Leu Cys Gly Ala  
1 5

<210> 70

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 70

Gln Phe Thr Gly Thr Ala Gly Ala Cys  
1 5

<210> 71  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide

<400> 71  
Glu Lys Arg Pro Phe Met Cys Ala Tyr  
1 5

<210> 72  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic Peptide  
Xaa at position 2 means Tyr, Phe, Met or Trp, and Xaa at position  
9 means Phe, Leu, Ile, Trp or Met.

<400> 72  
Cys Xaa Thr Trp Asn Gln Met Asn Xaa  
1 5

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

JP2004/000254

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/06, C07K7/08, C07K14/82, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C07K7/06, C07K7/08, C07K14/82, A61K39/00, A61P35/00, A61P37/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	DI MODUGNO, F. et al., MHC-peptide binding: dimers of cysteine-containing nonapeptides bind with high affinity to HLA-A2.1 class I molecules., J.Immunother., 1997, Vol.20, No.6, pages 431 to 436	<u>1-3, 7-9</u> 4-6
Y	MARASTONI, M. et al., Design of dimeric peptides obtained from a subdominant Epstein-Barr virus LMP2-derived epitope., Eur.J.Med.Chem., 2000, Vol.35, No.6, pages 593 to 598	1-9

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
12 April, 2004 (12.04.04)Date of mailing of the international search report  
27 April, 2004 (27.04.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000254

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 00/18795 A2 (CORIXA CORP.), 06 April, 2000 (06.04.00), & JP 2002-525099 A & EP 1117687 A2 & AU 9964078 A & NO 200101613 A & BR 9914116 A & KR 2001085861 A & HU 200103598 A2 & CN 1336935 A & CZ 200101144 A3 & ZA 200102606 A & NZ 510600 A	1-9
Y	WO 02/79253 A1 (HARUO SUGIYAMA), 10 October, 2002 (10.10.02), & EP 1371664 A1 & KR 200384970 A & BR 200208183 A	1-9

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

JP2004/000254

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000254

**Box No. II** Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in claim 10 pertains to methods for treatment of the human body by therapy.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III** Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 7/06, C07K 7/08, C07K 14/82, A61K 39/00, A61P 35/00, A61P 37/04

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C07K 7/06, C07K 7/08, C07K 14/82, A61K 39/00, A61P 35/00, A61P 37/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

REGISTRY (STN), CA (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	DI MODUGNO, F. et al. MHC-peptide binding: dimers of cysteine-containing nonapeptides bind with high affinity to HLA-A2.1 class I molecules. J. Immunother. 1997, Vol. 20, No. 6, p. 431-436	1-3, 7-9 4-6
Y	MARASTONI, M. et al. Design of dimeric peptides obtained from a subdominant Epstein-Barr virus LMP2-derived epitope. Eur. J. Med. Chem. 2000, Vol. 35, No. 6, p. 593-598	1-9

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

- の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

12. 04. 2004

国際調査報告の発送日 27. 4. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448



## 第I欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第1ページの1. bの続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期

☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査できないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。  
つまり、

請求の範囲 10 は、人の身体の治療方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であって PCT 規則 6.4(a) の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。